

PENGENDALIAN PENYAKIT MAS (*MOTILE AEROMONAS SEPTICEMIA*) PADA LELE DUMBO (*CLARIAS GARIEPINUS*) MELALUI VAKSINASI

The Control of Motile Aeromonas Septicemia (MAS) Diseases by Vaccination on African Catfish (Clarias gariepinus)

Olga¹, Langkah Sembiring² dan Triyanto³

Program Studi Biologi

Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada

ABSTRACT

The aim of this study is to find out the protein of *Aeromonas hydrophila* as a good vaccine and to evaluate of the efficacy of these protein to control the MAS diseases on African catfish (*Clarias gariepinus*).

A. hydrophila was isolated from the kidney of African catfish sickness. The most virulent of *A. hydrophila* was broken by sonication into cell free extract and debris. The protein of cell free extract with molecular weight 40 - 100 kDa were isolated by electrophoresis and electroelution. The research was constructed as CRD with five treatments and three replicates. Furthermore, it was analyzed by ANAVA and Duncan's Multiple Range Test. The number of African catfish used in this research were 225, were divided into five treatments, i.e.; (A) vaccine with molecular weight 86.578 kDa, (B) vaccine with molecular weight 53.521 kDa, (C) vaccine with molecular weight 40.750 kDa, (D) vaccine with cell free extract, (E) control was infected by sterile PBS. The dosage was 5 µg/fish. Parameter to controlled were antibody titer, Relative Percent Survival (RPS), Meant Death Time (MTD) and water quality.

The results showed that vaccines were significant differences ($P < 0.05$) from control to antibody titer, RPS (A = 40.91 %, B = 70.45 %, C = 59.09 %, and D = 75.00 %) and MTD (A = 2.33 days, B = 1.83 days, C = 2.06 days, D = 1.72 days, and E = 1.02

¹ Fakultas Perikanan Universitas Lambung Mangkurat, Banjarbaru.

² Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

³ Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

...ON ... CAUSE. THESE RESULT WERE NOT SIGNIFICANT differences between vaccine types ($P>0,05$). The conclusion that the protein of *A. hydrophila* vaccine with molecular weight 86.578 kDa, 53.521 kDa and 40.750 kDa increasing antibody titer, RPS and to extend MTD on African catfish. However the vaccine with 53,521 kDa molecular weight was the best vaccine.

Keywords : *A. hydrophila*, molecular weight of protein, vaccination, African catfish

PENGANTAR

Penyakit *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS) yang disebabkan oleh bakteri *A. hydrophila* di Indonesia saat ini merupakan penyakit bakterial penting pada budidaya ikan air tawar. Tingkat kerugian yang disebabkan oleh wabah penyakit MAS cukup tinggi dan menyebabkan usaha budidaya ikan tidak maksimal (Triyanto *et al.*, 1997) serta harga jual ikan menjadi merosot karena adanya cacat.

Berbagai usaha telah dilakukan berupa penanggulangan melalui penggunaan obat-obatan dan antibiotik, tetapi hasilnya kurang memuaskan. Penggunaan obat-obatan yang secara terus menerus akan menimbulkan masalah, yaitu timbulnya patogen yang resisten, penimbunan residu obat-obatan di dalam tubuh ikan, maupun pencemaran lingkungan yang akhirnya dapat mempengaruhi organisme perairan yang berguna (Wu *et al.*, 1981). Selain itu juga dengan cara pencegahan melalui sanitasi lingkungan, peningkatan nutrisi yang diberikan dan vaksinasi.

Vaksinasi merupakan salah satu pencegahan terhadap penyakit ikan dengan merangsang kekebalan ikan yang divaksin terhadap suatu penyakit tertentu pada ikan (Supriyadi & Rukyani, 1990). Di samping itu vaksinasi tidak menimbulkan dampak yang negatif baik pada ikan, lingkungan maupun konsumen. Dengan demikian, penggunaan vaksin tampaknya mempunyai harapan yang cukup baik.

Vaksinasi sangat praktis dan efisien, namun ada beberapa hal yang perlu dipertimbangkan dalam pembuatan vaksin seperti antigen yang heterogen, imunitas yang relatif rendah dan cara aplikasinya di lapangan (Pasaribu *et al.*, 1990). Diketahui juga bahwa efektifitas vaksinasi sangat tergantung pada jenis dan kualitas vaksin, cara

vaksinasi (Souter 1984 *cit.* Nitimulyo *et al.*, 1997), kondisi ikan (Dorson, 1984) dan lingkungan khususnya kualitas air (Ellis, 1988).

Sampai saat ini, telah dilakukan pembuatan dan uji lapang vaksin bakteri *A. hydrophila* berupa vaksin 'supernatan, whole cell' dan antigen O tetapi hasilnya masih belum memuaskan (Nugroho *et al.*, 1990; Nitimulyo *et al.*, 1997).

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan protein dari bakteri *A. hydrophila* yang dapat dijadikan sebagai antigen yang efektif dan mengetahui efikasi vaksin protein bakteri *A. hydrophila* dalam mengendalikan penyakit MAS pada ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*).

CARA PENELITIAN

Penyediaan sampel lele dumbo sakit dan isolat bakteri *A. hydrophila*

Sampel ikan lele dumbo sakit yang diduga terkena serangan bakteri *A. hydrophila* diambil dari daerah Sleman dan Moyudan. Isolat *A. hydrophila* diisolasi dari ginjal lele dumbo sakit dan diperoleh sebanyak 7 (tujuh) isolat.

Uji Patogenisitas bakteri *A. hydrophila*

Suspensi masing-masing isolat *A. hydrophila* sebanyak 0,1 ml diinfeksi pada lele dumbo ukuran 10 - 13 cm dan berat rata-rata 14 - 16 g untuk mengetahui apakah isolat-isolat hasil isolasi merupakan bakteri patogen pada lele dumbo. Bakteri diisolasi dari ginjal lele dumbo yang menunjukkan gejala penyakit MAS.

Karakterisasi dan identifikasi bakteri *A. hydrophila*

Isolat-isolat bakteri yang diperoleh dikarakterisasi dan diidentifikasi sifat-sifatnya melalui morfologi koloni, morfologi sel dan uji biokimia.

Preparasi isolasi protein *A. hydrophila*

Isolat *A. hydrophila* yang paling virulen dikultur pada medium cair TSB selama 18-24 jam, kemudian dituang ke medium TSA dan diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam. Selanjutnya dipanen dan disentrifugasi dengan kecepatan 3.000 rpm pada suhu 4 °C selama 15 menit. Supernatan dibuang dan pelet dicuci dengan larutan PBS

(*Ammonium Buffer Saline*) pH 7,4. Sentrifugasi dan pencucian dilakukan sebanyak 3 kali. Pellet (sel) dipecah dengan sonikasi dengan gelombang suara 159 Hz sebanyak 6 kali, 30 detik, pada suhu 4 °C. Homogenat yang diperoleh disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit. Supernatan (*cell free extract*) dipisahkan dari debris sel. Supernatan difraksinasi menggunakan amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 0 - 100%. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 3.000 rpm, pada suhu 4 °C selama 15 menit. Supernatan akhir dibuang sedangkan endapan pada masing-masing fraksi dilarutkan dalam 0,01 M PBS pH 7,4. Masing-masing fraksi didialisis dalam bufer PBS pH 7,4. Supernatan dipisahkan proteinnya menggunakan SDS-PAGE elektroforesis dengan konsentrasi akrilamid 12 %. Protein marker yang digunakan adalah *Promega Mid-Ranger Protein MW Marker*, V5234. Protein dengan berat molekul 40 - 100 kDa diisolasi dengan cara memotong pita-pita protein, kemudian dielektroelusi dalam bufer TBE pH 8,0. Selanjutnya larutan protein yang diperoleh difreeze dryer pada suhu -70°C selama *overnight* hingga berbentuk serbuk. Masing-masing konsentrasi protein diukur dengan metode *Bio-rad Protein assay*.

Vaksinasi lele dumbo (*C. gariepinus*)

Vaksinasi dilakukan secara intramuskular dengan dosis 5 µg / 0,1 ml per ekor ikan. Sebanyak 225 ekor lele dumbo dibagi dalam 5 perlakuan yaitu : (A) vaksin protein *A. hydrophyla* dengan BM 86,578 kDa, (B) Vaksin protein *A. hydrophyla* dengan BM 53,521 kDa, (C) vaksin protein *A. hydrophyla* dengan BM 40,750 kDa, (D) vaksin *cell free extract*, (E) kontrol disuntik PBS steril. Vaksinasi dilakukan sebanyak dua kali meliputi vaksinasi awal dan satu minggu kemudian vaksinasi *booster*.

Uji tantang (*Challenge Test*)

Uji tantang dilakukan 2 minggu setelah vaksinasi *booster*. Infeksi dilakukan secara intramuskular berdasarkan hasil uji LC₈₀. Konsentrasi suspensi bakteri $2,34 \times 10^8$ CFU/ml dengan dosis 0,1 ml. Selanjutnya ikan dipelihara selama dua minggu. Pada minggu pertama, ikan yang telah diinfeksi tidak diberi makan, sedangkan minggu kedua diberi makan.

Pengamatan

Parameter yang diamati, yaitu titer antibodi, *Relative Percent Survival* (RPS), Rerata Waktu Kematian (RWK) dan kualitas air yang meliputi oksigen terlarut (DO), CO₂ bebas, Ammoniak, pH dan suhu.

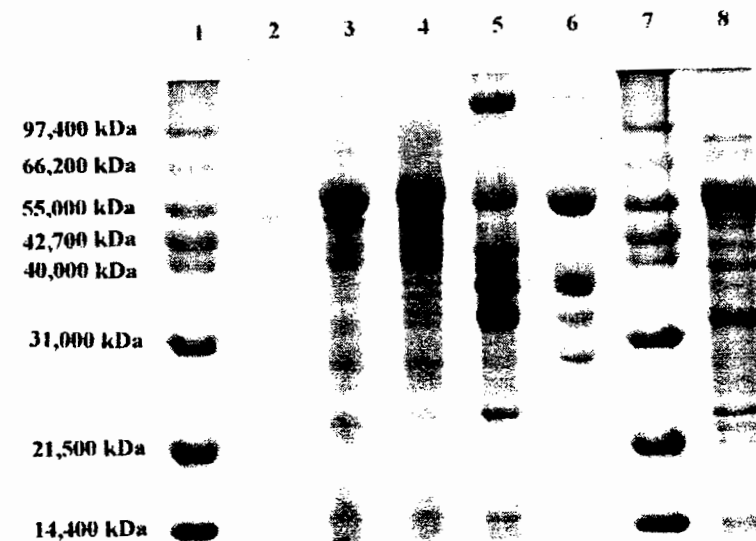
Analisis Data

Analisis data menggunakan Rancangan Acak Lengkap (*Completely Randomized Design*), ANAVA dan uji lanjut dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Protein *cell free extract A. hydrophila*

Hasil analisis SDS-PAGE dengan akrilamid gel 12 %, profil protein *cell free extract A. hydrophila* dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Profil protein *cell free extract* bakteri *A. hydrophila*. Lajur 1 & 7: Marker; lajur 2 - 6: Protein *cell free extract* hasil fraksinasi Amonium Sulfat pada tingkat kejenuhan: 0 - 20 % (lajur 2), 20 - 40 % (lajur 3), 40 - 60 % (lajur 4), 60 - 80 % (lajur 5), 80 - 100 % (lajur 6); lajur 8 : Protein total *cell free extract*

Pada Gambar 1. memperlihatkan adanya 21 pita protein *A. hydrophila*. Setelah pergerakan relatif (Rf) masing-masing protein dihitung, dengan bantuan kurva baku protein standar yang berupa hubungan logaritmik berat molekul protein standar dan nilai Rf diperoleh dari persamaan $y = -0,4007 \ln(x) + 4,1989$. Perkiraan BM berkisar antara 15,813 kDa - 101,454 kDa. Pita protein yang tebal dengan BM berkisar antara 40 kDa - 100kDa ada sebanyak tiga pita, yaitu BM 40,750 kDa, 53,521 kDa dan 86,578 kDa.

Titer Antibodi Lele Dumbo

Lele dumbo yang digunakan dalam penelitian ini belum mendapat kekebalan spesifik sebelum divaksinasi. Hal ini ditunjukkan dengan adanya nilai rerata titer antibodi sebesar 1. Setelah vaksinasi, terlihat adanya peningkatan titer antibodi (Tabel 1.)

Tabel 1. Rerata Titer antibodi lele dumbo selama penelitian

Perlakuan	Titer antibodi sampling ke-n				
	0	1	2	3	4
(A) Vaksin protein <i>A. hydrophila</i> BM 86,578 kDa	1 ^a	13,33 ^a	26,67 ^a	42,67 ^a	938,67 ^a
(B) Vaksin protein <i>A. hydrophila</i> BM 53,521 kDa	1 ^a	42,67 ^{bc}	85,33 ^b	128,00 ^b	1194,67 ^a
(C) Vaksin protein <i>A. hydrophila</i> BM 40,750 kDa	1 ^a	26,67 ^b	64,00 ^{ab}	74,67 ^a	1066,67 ^a
(D) Vaksin <i>cell free extract</i>	1 ^a	64,00 ^c	85,33 ^b	64,00 ^a	533,33 ^a
(E) Kontrol disuntik PBS steril	1 ^a	1 ^d	1,33 ^c	1 ^c	85,33 ^a

Keterangan: Rerata yang diikuti dengan huruf *superscript* yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada $\alpha = 0,05$ dan $0,01$. Sampling ke-0 = vaksinasi, sampling ke-1 = vaksinasi booster pertama, sampling ke-2 = uji tantang pertama, sampling ke-3 = uji tantang kedua, sampling ke-4 = panen.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa penggunaan vaksin berat molekul protein *A. hydrophila* dapat meningkatkan titer antibodi. Menurut Subowo (1993), protein merupakan antigen yang dapat merangsang limfosit untuk menghasilkan antibodi. Selanjutnya menurut Anderson (1974), mekanisme terbentuknya antibodi pada ikan yaitu setelah antigen masuk terjadi proses pengenalan antigen oleh makrofag. Pesan yang diterima segera dikirimkan ke limfosit yang merangsang perkembangan dan proliferasi limfosit yang selanjutnya melepaskan antibodi spesifik. Dengan penyuntikan suspensi asing akan membangkitkan produksi antibodi yang spesifik terhadap substansi asing tersebut.

Vaksin yang berasal dari protein *A. hydrophila* dengan BM 40, 750 kDa, 53,521 kDa dan 86, 578 kDa dapat merangsang respon imun humoral berupa pembentukan antibodi pada lele dumbo. Hal ini disebabkan karena protein merupakan makromolekul yang imunogen. Protein dengan berat molekul yang lebih besar dari 10 kDa biasanya bersifat imunogenik (Subowo, 1993). Walaupun diketahui bahwa molekul-molekul besar ini merupakan imunogen, tetapi hanya daerah-daerah permukaan tertentu dari molekul itu (epitop) yang menentukan spesifisitas reaksi antigen-antibodi dan juga sebagai penentu timbulnya respon imun (Almendras, 2001). Di samping itu, protein dengan berat molekul yang besar diduga mempunyai jumlah epitop yang banyak (Subowo, 1993).

Relative Percent Survival (RPS) setelah uji tantang dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Rerata RPS lele dumbo setelah uji tantang dengan bakteri *A. hydrophila*

Perlakuan	Rerata Relatif Percent Survival (%)
(A) Vaksin protein <i>A. hydrophila</i> BM 86,578 kDa	40,91 ^a
(B) Vaksin protein <i>A. hydrophila</i> BM 53,521 kDa	70,45 ^a
(C) Vaksin protein <i>A. hydrophila</i> BM 40.750 kDa	59,09 ^a
(D) Vaksin <i>cell free extract</i>	75,00 ^a

Keterangan: Rerata yang diikuti dengan huruf *superscript* yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada $\alpha = 0,01$ dan $0,05$

Meskipun terlihat adanya perbedaan pada rerata nilai RPS antar perlakuan (Tabel 2.), namun berdasarkan hasil analisis sidik ragam rerata nilai RPS antar perlakuan tidak berbeda nyata ($P > 0,05$). Hal ini diduga karena RPS dalam masing-masing ulangan dalam tiap perlakuan nilainya tidak seragam. Kemungkinan disebabkan karena setiap individu ikan dalam ulangan masing-masing perlakuan mempunyai tingkat respon imun yang berbeda dalam menanggapi serangan bakteri *A. hydrophila* pada saat uji tantang kedua. Karena pada saat uji tantang kedua ini konsentrasi suspensi yang diinfeksi pada ikan tidak berdasarkan nilai LC_{50} melainkan LC_{80} , yaitu $2,34 \times 10^8$ CFU/ml. Selain itu diduga bahwa selama uji tantang ada kematian ikan yang tidak disebabkan oleh bakteri melainkan disebabkan karena munculnya sifat kanibalisme sesama benih itu sendiri, karena selama 7 hari uji tantang lele dumbo sengaja tidak diberi pakan.

Nilai RPS dalam penelitian ini, pada perlakuan vaksin *cell free extract* sebesar 75 % dan perlakuan vaksin protein dengan BM 53,521 kDa lebih tinggi apabila dibandingkan dengan RPS lele dumbo yang diberi vaksin *cell free extract* dengan dosis 5 µg sebesar 66,7% pada penelitian Murtiningsih (2003).

Rerata Waktu Kematian (RWK) lele dumbo selama uji tantang disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Rerata Waktu Kematian (RWK) selama uji tantang dengan bakteri *A. hydrophila*.

Perlakuan	Rerata waktu kematian (hari)
(A) vaksin protein <i>A. hydrophila</i> BM 86,578 kDa	2,33 ^a
(B) vaksin protein <i>A. hydrophila</i> BM 53,521 kDa	1,83 ^a
(C) vaksin protein <i>A. hydrophila</i> BM 40,750 kDa	2,06 ^a
(D) vaksin <i>cell free extract</i>	1,72 ^a
(E) Kontrol disuntik PBS steril	1,02 ^b

Keterangan: Rerata yang diikuti dengan huruf *superscript* yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada $\alpha = 0,05$ dan $0,01$

Perkembangan bakteri dan luka dapat dideteksi pada kulit, organ lain dan diteruskan ke seluruh tubuh, kemudian diikuti mekanisme infeksi. Masuknya bakteri ke aliran darah dan berakhir pada sistem kapiler menyebabkan infeksi sistemik. Kematian ikan ditandai dengan berhentinya jantung dan terhambatnya pernafasan akibat serangan bakteri (Harada *et al.*, 1989).

Dalam penelitian ini adanya perbedaan nyata ($P < 0,05$) antar RWK perlakuan ikan yang diberi vaksin dengan yang tidak diberi vaksin disebabkan karena pada ikan yang divaksin terdapat kekebalan yang spesifik sehingga pada waktu diinfeksi bakteri *A. hydrophila*, ikan-ikan ini masih mampu bertahan, meskipun kemudian ada yang mati, sedangkan pada ikan yang tidak divaksin ini tidak mempunyai kekebalan spesifik sehingga pada saat diinfeksi dengan bakteri *A. hydrophila*, mereka tidak mampu bertahan hidup lama. Hal ini sesuai dengan penelitian Spense *et al.* (1965 cit. Nitimulyo *et al.*, 1994) yang menjelaskan bahwa vaksinasi untuk mencegah bakteri *A. salmonicida* selain menurunkan kematian ikan, juga dapat memperpanjang waktu kematian ikan perlakuan dibandingkan kontrol.

Kualitas air yang diuji menunjukkan suhu air 25,5 – 30,5 °C, oksigen terlarut, CO₂ terlarut 4,5 – 27,07 ppm, amoniak 0,0018 – 0,0298 ppm dan pH 6,9 – 7,3. Secara umum kualitas air yang diamati masih dalam kisaran yang mendukung kehidupan lele dumbo

KESIMPULAN

Vaksin protein *A. hydrophila* dengan berat molekul 40,750 kDa, 53,521 kDa dan 86,578 kDa, serta *cell free extract* dapat digunakan sebagai vaksin dalam mengendalikan penyakit MAS pada lele dumbo. Dari keempat jenis vaksin protein ini, protein dengan berat molekul 53,521 kDa adalah yang paling efektif. Efektivitas vaksin tersebut dilihat dari meningkatnya produksi titer antibodi, sedangkan efikasinya dilihat dengan tingginya nilai *Relatif Percent Survival* (RPS) dan semakin panjangnya waktu kematian ikan yang diberi vaksin dibandingkan kontrol.

DAFTAR PUSTAKA

- Almendras, J.M.E., 2001. Immunity and Biological Methods of Disease Prevention and Control. In: *Health Management in Aquaculture* (G.D.Lio-po, C.R. Lavilla & E.R. Cruz-Lacierda, eds), Aquaculture Departement Southeast Asian Fisheries Development Center, Philippines. P 111 – 136.
- Anderson, D.P., 1974. Fish Immunology. *Disease of Fishes*. Volume 4. T.F.H Publication. Inc Ltd. The British Crown Colony of Hongkong. 239 p.
- Harada, T.Y., Hakayama, K.H, S.S Kubota, T. Bunya & G Hoshiai, 1989. Histology of BKD (Bacterial Kidney Disease) Occure in Sea cultured Coho Salmon (*Oncorhynchus kisuth*). *J. Fish Patology*. 24(1) : 17 – 21.
- Murtiningsih, 2003. Penggunaan Vaksin Protein Sitoplasma Bakteri *A. hydrophila* pada Lele dumbo (*Clarias gariepinus*). *Skripsi*. Fakultas Pertanian Jurusan Perikanan. Universitas Gadjah Mada. Tidak dipublikasi.
- Nitimulyo, K.H., Triyanto & Sri Hartati, 1994. *Penanggulangan Penyakit Motil Aeromonas Septicemia (MAS) pada ikan Lele (Clarias sp)*. Lembaga Penelitian UGM dan Balitbang Pertanian. Yogyakarta. 45 hal

Kemangkusan Tetrasiklin untuk Penanggulangan Penyakit Mas: pada Pendederan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*). *Jurnal Perikanan UGM (GMU Journal Fisheries Science*, I (2) : 25 - 30.

- Nugroho, E., S.L. Angka, & D. Bastiawan, 1990. Peningkatan Daya Tahan Ikan terhadap Infeksi *Aeromonas hydrophila* dengan Cara Vaksinasi. *Prosiding Seminar Nasional II Penyakit Ikan dan Udang 16 - 18 Januari*. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Hal. 83 -86.
- Pasaribu, F. H., N. Dalimunthe & M. Poeloengan, 1990. Pengobatan dan pencegahan Penyakit Ikan Bercak Merah. *Prosiding Seminar Nasional II Penyakit Ikan dan Udang 16 - 18 Januari*. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Hal. 143 - 152.
- Subowo, 1993. *Imunobiologi*. Penerbit Angkasa Bandung. 233 halaman.
- Supriyadi, H & A. Rukyani., 1990. Imunoprofilaksis dengan Cara Vaksinasi pada Usaha Budidaya Ikan. *Prosiding Seminar Nasional II Penyakit Ikan dan Udang 16 - 18 Januari*. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Hal 64 - 69.
- Triyanto, Kamiso H.N., A. Isnansetyo & Murwantoko, 1997. Pembuatan Antigen Murni Untuk Memproduksi Polivalen Antibodi dan Vaksin *Aeromonas hydrophila*. *Laporan Penelitian Hibah Bersaing V/1 Perguruan Tinggi Tahun Anggaran 1996-1997*. Fakultas Pertanian UGM Yogyakarta. 37 hal.
- Wu, J., H.Lin, L. Jan, Y. Hsu & L. Chang, 1981. Biological Control of Fish Bacterial Pathogen, *Aeromonas hydrophila* by Bacteriophage AH 1. *Fish Patholology*, 15(3/4):271-276.